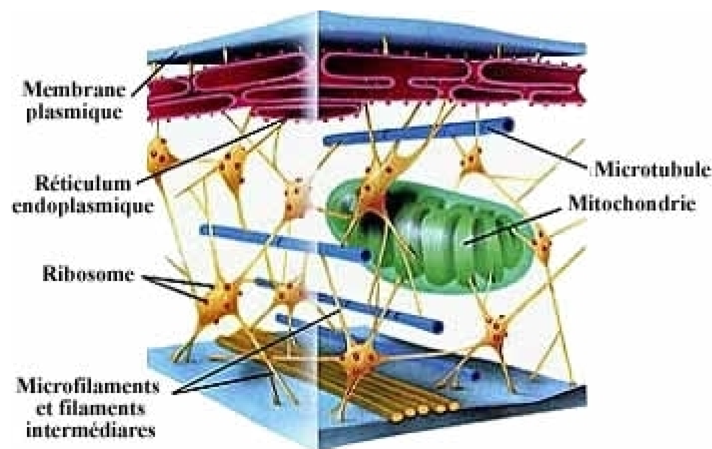
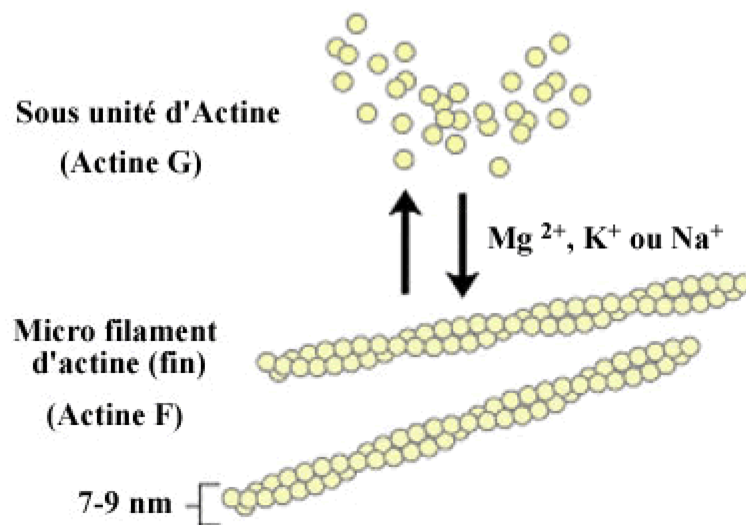
INTRODUCTION

Le cytosquelette est un réseau complexe de filaments protéiques s'étendant dans tout le cytoplasme, et organisant celui-ci, permettant aux cellules eucaryotes de s'adapter à une grande variété de changements morphologiques, d'effectuer des mouvements coordonnés. Le cytosquelette est constitué de trois types de filaments protéiques: les**microfilaments d'actine** (7 à 9 nm de diamètre), les **microtubules** (25 nm de diamètre) et les **filaments intermédiaires** (10 nm de diamètre). Après quelques rappels sur ces structures, nous verrons dans ce cours le rôle des différents éléments du cytosquelette dans le cycle viral, plus spécialement dans les phénomènes de transport viral, avant d'envisager différents exemples d'altération du cytosquelette observés lors de l'infection d'une cellule par un virus.



I- LES MICROFILAMENTS D'ACTINE

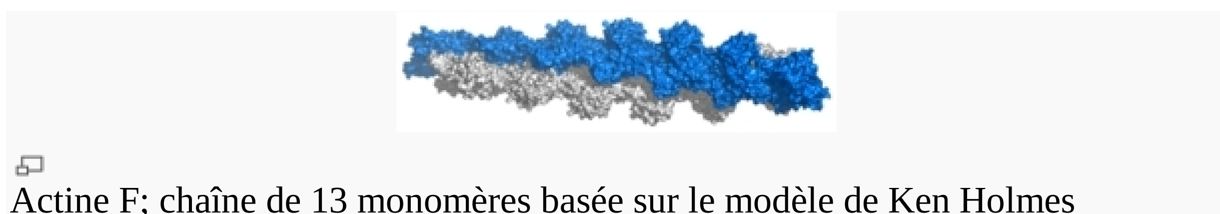
L'**actine** est la protéine intracellulaire prépondérante dans la cellule eucaryote, et représente, selon les types cellulaires, de **1 à 10% de la quantité totale des protéines cellulaires**, pour une concentration dans le cytosol de l'ordre du millimolaire. Cette protéine de taille moyenne (375 acides aminés) se présente dans la cellule soit sous forme de **monomère globulaire (actine G)** soit sous forme de **polymère (actine F)**. Le microfilament d'actine F, d'un diamètre de 7 à 9 nm, est une structure polaire, avec une extrémité à croissance rapide (appelée "+") et une extrémité à croissance lente ("-"). La polymérisation de l'actine G en micro filaments d'actine F est amorcée par l'ajout d'ions Mg^{2+}, K^+ ou Na^+, selon un processus réversible, l'actine F se dépolymérisant quand on abaisse la force ionique de la solution. Dans la cellule, il existe un équilibre dynamique entre la forme monomérique (G) d'actine et la forme filamenteuse (F), le passage de l'actine G à l'actine F étant régulé par des protéines associées à l'actine, en réponse à différents stimuli.



Le réseau d'actine est localisé d'une part juste sous la membrane plasmique, où il constitue un maillage bi-dimensionnel associé à la membrane, et au sein de la cellule, où il constitue un réseau tri-dimensionnelconférant un aspect gélatineux au cytosol. De nombreuses protéines interagissant avec l'actine ont été identifiées: elles sont impliquées dans des **fonctions** aussi diverses que la **consolidation des filaments** (ex: tropomyosine), la**formation de faisceaux de filaments** ou "bundles" (ex: fimbrine), la **fragmentation des filaments** (ex: gelsoline), le **mouvement des vésicules sur les filaments** (ex: myosine II) ou encore l'**ancrage des filaments à la membrane plasmique** (ex: spectrine). Tous ces jeux de protéines liant l'actine peuvent agir de façon coopérative pour engendrer les mouvements de la surface cellulaire, la phagocytose et la locomotion cellulaire.

Un **filament d'actine**, ou **microfilament**, est un homopolymère d'actine, protéine de 42 kDa (Unité de masse atomique). C'est un constituant essentiel du cytosquelette des cellules eucaryotes, ainsi que des fibres musculaires. L'actine sous forme de filaments est parfois appelée actine F (Fibrillaire), tandis que la forme monomérique est appelée actine G (Globulaire).

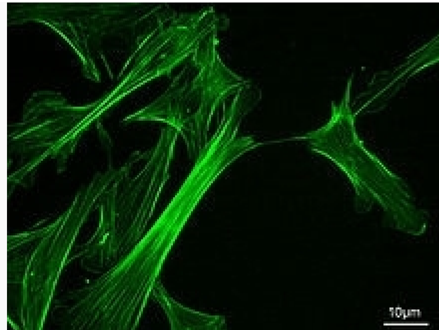
Structure d'un filament



Actine F; chaîne de 13 monomères basée sur le modèle de Ken Holmes

Un filament d'actine est composé de deux monomères d'actine, enroulés l'un autour de l'autre, dans une hélice double. Un filament a un diamètre d'environ 7 nm, et une longueur de persistance d'environ 17 µm, soit l'ordre de grandeur du diamètre des cellules.

Dynamique de polymérisation



Filaments d'actine des fibroblastesd'embryons de souris, marqués à laphalloïdine.

L'actine G globulaire se polymérise en actine F (filament d'actine).
La polymérisation s'amorce par une phase de nucléation, où sont formés majoritairement des trimères. Les monomères s'assemblent ensuite suivant une double hélice, qui n'a donc pas de centre de symétrie. À l'une des extrémités, notée (+) ou extrémité barbue ou encore en brosse, les constantes cinétiques sont en ordre de grandeur 10 fois supérieures à celles de l'autre extrémité, notée (-) ou extrémité pointue. En outre, les monomères associés à l'ATP (ATP-actine), présents en majorité dans les cellules vivantes, ont plus tendance à polymériser que ceux associés à l'ADP (ADP-actine).

L'actine associée à un filament a tendance à hydrolyser son ATP. Cette propriété est, avec la polarité du filament, à l'origine du phénomène dit de "tapis roulant" (anglais : treadmilling). En effet, l'extrémité (+) va avoir tendance à capter en très grande majorité de l'ATP-actine, favorisant par conséquent la polymérisation à cette extrémité. En revanche, l'extrémité (-) étant moins active, l'actine du filament qui en est proche a passé plus de temps sous forme filamentaire, et est majoritairement sous forme d'ADP-actine. Par conséquent, à l'extrémité (-) l'équilibre est déplacé vers la dépolymérisation.

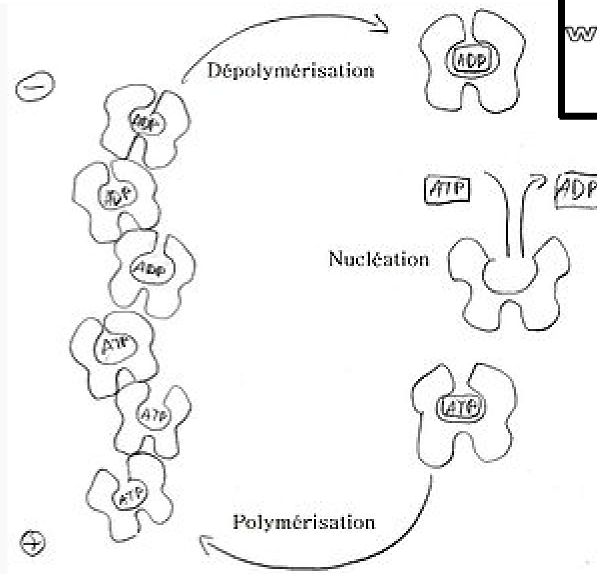




Schéma explicatif du phénomène de polymérisation du filament

Ces deux déplacements d'équilibre concomitants font que la chaîne croît en permanence du côté (+) et décroît du côté (-). Si on maintient un monomère central fixe, l'ensemble de la chaîne semble donc se déplacer. L'apport d'énergie nécessaire pour maintenir cet état hors équilibre se fait dans le milieu liquide environnant, où l'ADP-actine est régénérée en ATP-actine. Le terme "tapis roulant" suggère que les monomères quittant l'extrémité (-) reviennent se fixer à l'extrémité (+) après un passage en solution. Cependant, aucune masse n'est transportée macroscopiquement. Ce processus permet la réalisation d'unmoteur moléculaire qui permet à certaines cellules de se déplacer au moyen d'un lamellipode. Il est aussi à l'origine du mouvement de la bactérie Listeria. Cependant, plusieurs autres protéines sont nécessaires et l'actine seule ne peut pas convertir l'énergie chimique d'hydrolyse de l'ATP en travail.

Protéines associées

Les protéines associées à l'actine (en anglais, *Actin associated proteins*, ou AAP) sont la clef du contrôle par la cellule de son stock d'actine. Elles permettent de réguler la polymérisation et d'organiser spatialement les filaments. Elles sont à leur tour contrôlées par des protéines régulatrices qui s'insèrent dans le réseau complexe interagissant avec toute la cellule.

Protéines de réticulation

- Fimbrine : maintient les filaments serrés d'actine fasciculée.
- alpha actinine : protéine dimérique liant 2 microfilaments entre eux, les maintenant parallèles entre eux. (point focal d'ancrage...). Elle se lie au pôle

+ pour permettre l'intéraction actine-myosine notamment dans le mouvement amiboïde.

- Filamine : bloque l'actine réticulée pour l'empêcher de passer en actine fasciculée.
- Villine : maintient les filaments serrés d'actine fasciculée, spécifique des microvillosités.
- spectrine : permet l'accrochage du microfilament d'actine a la membrane plasmique

Protéines motrice

- Myosine de type 1 : maintient l'actine large fasciculée avec l'aide de l'alpha-actinine.
- Myosine de type 2 : contraction musculaire.

Rôles

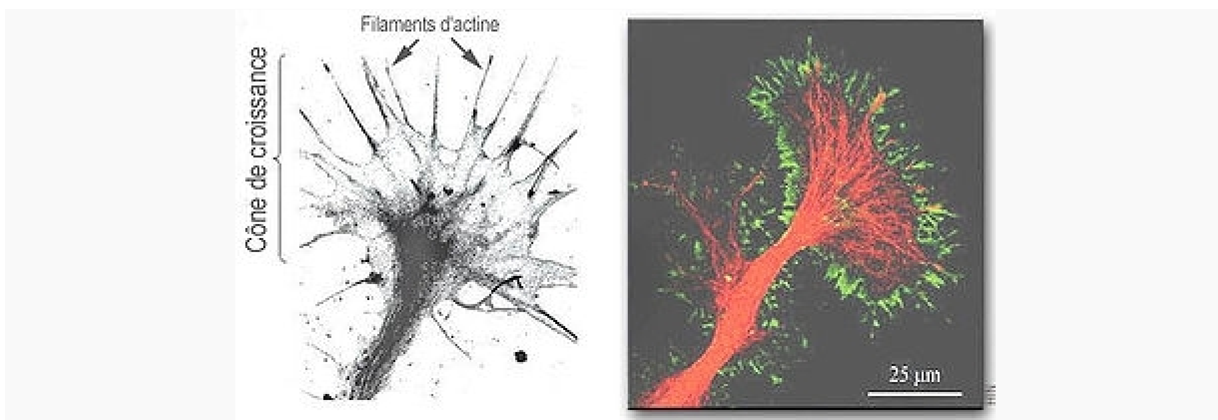


Image du cône de croissance d'un neurone de papillon (Sphinx du tabac) ; en microscopie électronique à gauche, et en Microscopie à fluorescence à droite, mettant différemment en valeur les filaments d'actine

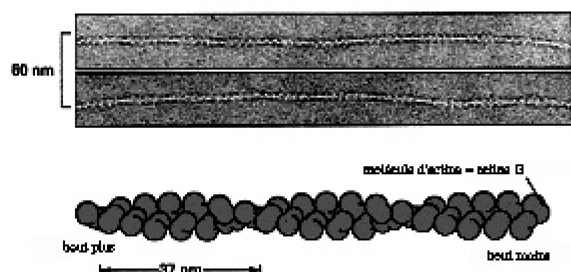
- Maintien des édifices structuraux par exemple des villosités.
- Mouvements intracellulaires : contraction des cellules musculaires striées: ces cellules musculaires sont organisées en myofibrilles (= disposition particulière des filaments d'actines et de myosines et d'autres protéines). L'unité fonctionnelle de la myofibrille est le sarcomère qui va se raccourcir lors de la contraction. /contraction des cellules musculaires lisses: pas d'organisation sarcomérique, arrangement particulier des filaments qui parcourent la cellule transversalement, longitudinalement et en diagonale, pour s'insérer sur les corps denses.

- Les mouvements cellulaires : déplacement de l'amibe, des leucocytes (pseudopodes).
- La cytodiérèse (en fin de division cellulaire).
- La formation des jonctions cellulaires (y compris des neurones, via le « *cône de croissance* »).
- Le mouvement des organites : chez les végétaux supérieur le déplacement des chloroplastes dans la cellule en fonction des conditions lumineuse fait intervenir les filaments d'actine.

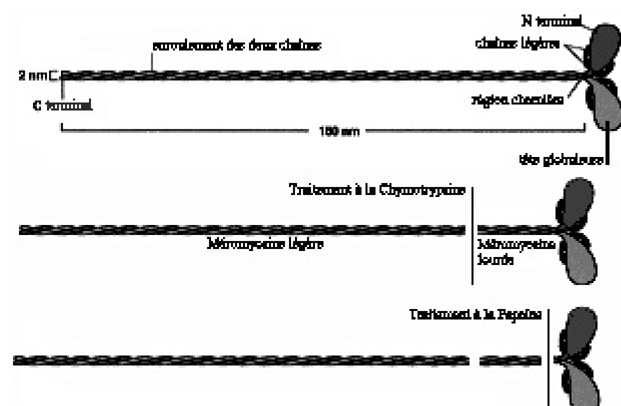
Petit résumé :



a) Les Microfilaments. filaments minces (actine), filaments épais (myosine)

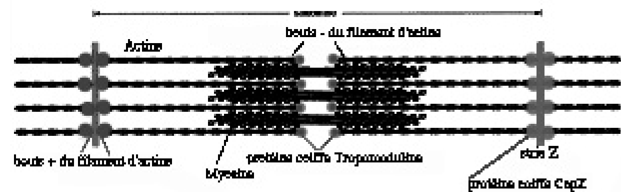


1 - L'Actine. très répandue dans le règne animal (muscle, nombreuses cellules).
Les microfilaments ou Actine F sont des polymères d'actine G, éléments globulaires de nature monomérique (PM : 42 000) mais qui présentent une forme en haltère.
L'actine F correspond à l'enroulement hélicoïdal d'actine G. La polymérisation requiert la présence d'ATP dans la molécule d'actine G. L'hydrolyse de l'ATP provoque la polymérisation en actine F et l'ADP reste piégé à l'intérieur de la molécule d'actine.
*In vitro, les monomères d'actine s'associent en présence d'ions Mg++, K+ ou Na+.
*Des solutions de monomères d'actine G additionnées d'ions deviennent de plus en plus visqueuses.
* Les monomères s'associent 5 à 10 fois plus vite à l'extrêmité dite plus qu'à l'autre extrémité dite moins.
* L'actine F est en général beaucoup plus stable que les microtubules. (il existe des cas ou l'actine F est labile).

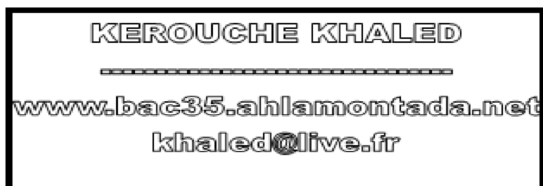


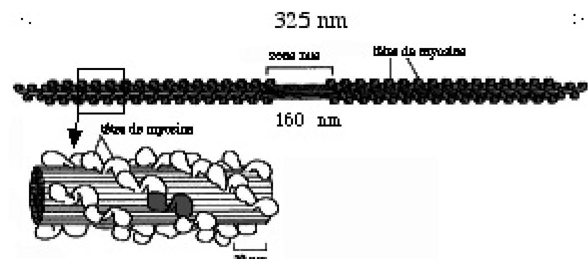
2 - La Myosine.
Les analyses biochimiques révèlent une dizaine de sortes de myosine, mais les

myosine de type I et de type II sont les plus abondantes. Dans les cellules non musculaires on trouve le type I et dans les cellules musculaires on trouve le type I et II. La Myosine de type I est monomérique, elle interagit au niveau de liaisons entre la membrane et le cytosquelette. On étudiera la Myosine de type II qui est dimérique, son rôle est associée étroitement à la contraction musculaire.
La Myosine de type II.
La molécule est constituée de deux chaînes lourdes
PM : 230 000 HC (heavy chain)
et de deux paires de chaînes légères PM : 20 000 LC1 et PM : 17 000 LC2 (light chain)
Dans le muscle, 300 à 400 molécules s'associent en filaments épais.
Dans le muscle strié, l'alternance des disques clairs et disques sombre est due à l'organisation des fibres d'actine et de myosine au sein d'une myofibrille.

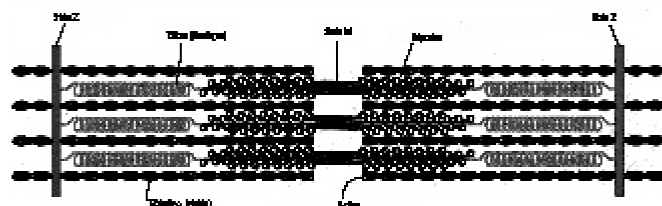


Les bouts des filaments d'actine sont stabilisés par des protéines coiffes.
Bouts - : la tropomoduline Bouts + : la protéine CapZ.
Les filaments d'actine sont rigidifiés par une protéine qui s'enroule en spirale autour d'eux, la nébuline.





Les filaments de myosine sont maintenus en place par des protéines élastiques, la titine.
La contraction musculaire met en jeu des molécules associées au filament d'actine.

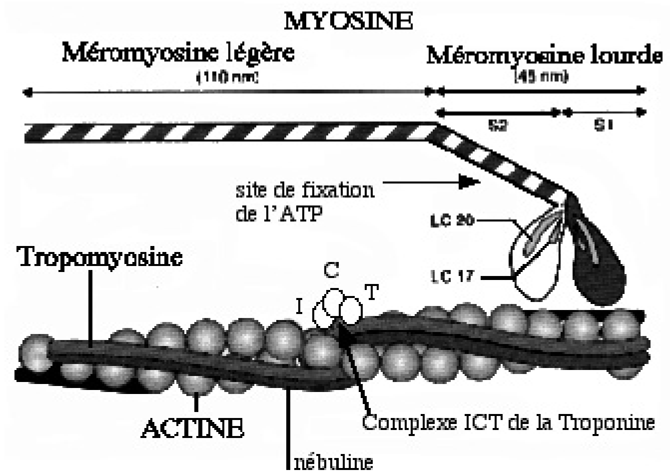


- **La tropomyosine**, protéine filamenteuse enroulée en spirale dans le sillon hélicoïde du brin d'actine.

- **La Troponine** constituée de 3 sous unités :I, T et C.

Rôles :

La troponine I,
(Inhibitrice) se lie à l'actine, déplace la tropomyosine sur le brin d'actine masquant ainsi les sites de liaisons de l'actine avec la myosine d'où l'effet inhibiteur (repos).

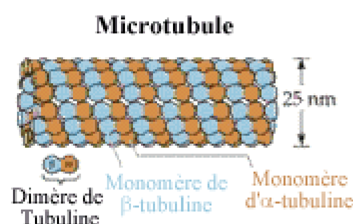


La troponine T lie la troponine à la tropomyosine.
La troponine C (semblable à la calmoduline, protéine de transport du Ca++).
La liaison du Ca++ et de la Troponine C inhibe la liaison entre la troponine I et l'actine, provoquant le déplacement de la tropomyosine sur l'actine, ce qui démasque les sites de fixations des têtes de myosine sur l'actine, et engage la contraction.



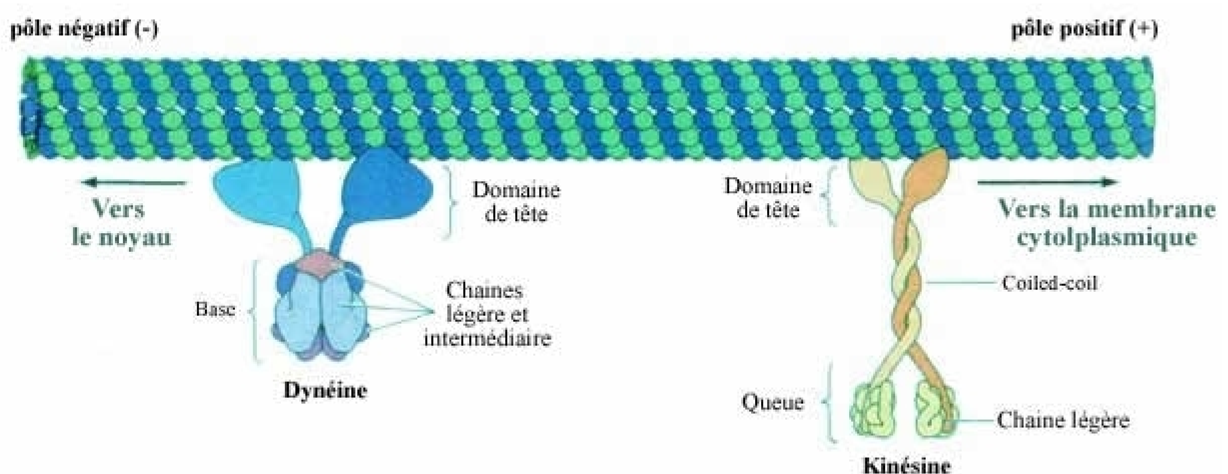
II- LES MICROTUBULES

Les microtubules sont des tubes creux, de 24 nm de diamètre, constitués de 13 protofilaments de tubuline, chaque molécule de tubuline étant un hétérodimère d'α et de β-tubuline.



Dans les cellules animales, les microtubules se dépolymérisent et se repolymérisent continuellement, constituant un réseau dynamique (énergie fournie par le GTP) polarisé qui irradie du centrosome vers la périphérie.

Comme dans le cas de l'actine, des protéines peuvent, selon les types cellulaires, exercer une stabilisation des microtubules. Ces protéines, appelées MAP ("Microtubule Associated Protein"), sont capables de stabiliser les microtubules en des localisations précises du cytoplasme; ainsi, dans les neurones, la protéine MAP2 est présente dans les dendrites et le corps cellulaire, mais absente de l'axone, où sont trouvées certaines formes de protéine Tau, suggérant un rôle des MAPs dans la compartimentation cytoplasmique et l'orientation sélective des microtubules.
Le réseau microtubulaire intervient particulièrement dans la mobilité intra- et extra-cellulaire, dans la morphologie et la division cellulaire par deux mécanismes distincts: d'une part l'assemblage et le désassemblage des microtubules permettent la migration d'un "cargo" lié à l'une des extrémités; d'autre part, les microtubules peuvent constituer de véritables rails, sur lesquels des moteurs moléculaires, ayant lié un cargo, peuvent se déplacer.



Ainsi des molécules de la famille des kinésines permettent le transport du pôle négatif au pôle positif du microtubule (transport antérograde, c'est-à-dire du centre de la cellule vers la périphérie), tandis que la dynéine permet un transport du pôle positif vers le pôle négatif (transport rétrograde, c'est-à-dire de la périphérie vers le centre cellulaire).

Les structures microtubulaires

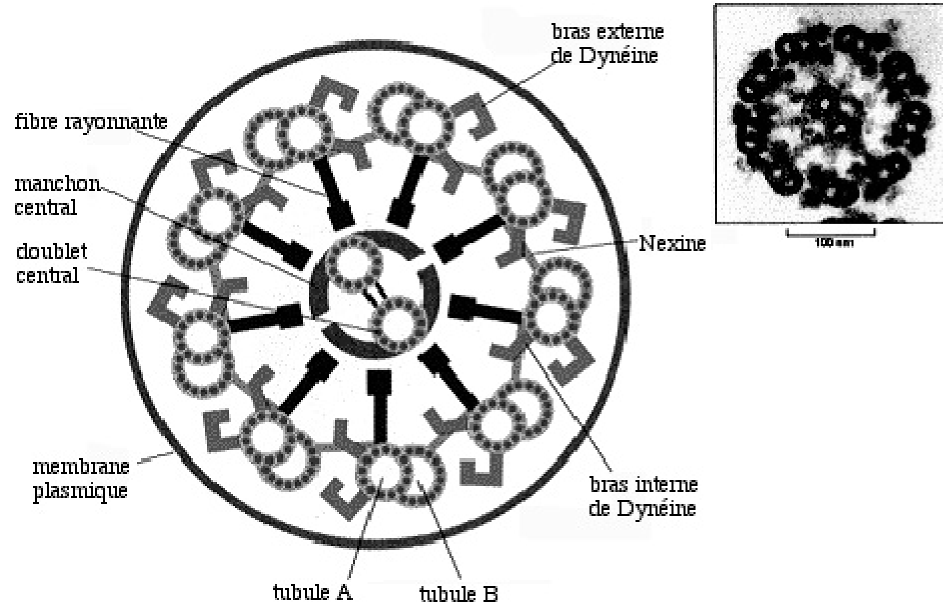
1 - Centrosomes et corpuscules basaux.

Centrosomes. Formés de deux centrioles à l'origine de la formation des microtubules intracellulaires et des microtubules du fuseau mitotique. COMT (Centre Organisateur des MicroTubules).

Structure d'un centriole.
Centrosomes et corpuscules basaux sont interchangeables. Les C.B. donnent naissance aux M.T. des cils et des flagelles.

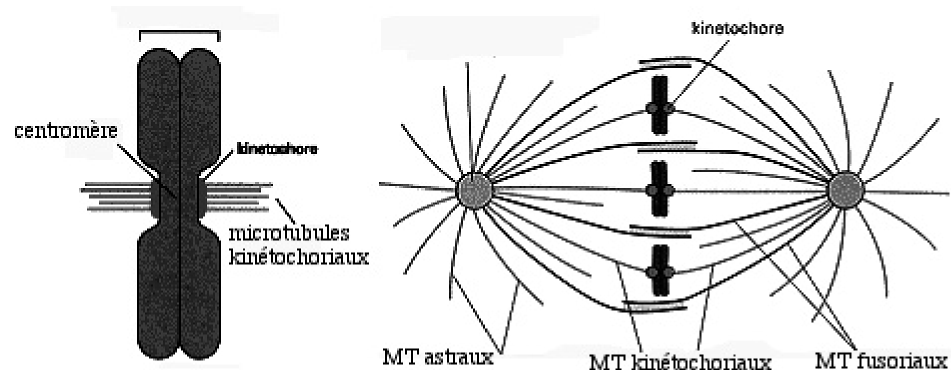


2 - Cils et flagelles.



Coupe transversale d'un cil ou d'un flagelle. Organes locomoteurs de nombreux Protozoaires, ils sont présents aussi chez les métazoaires aquatiques et terrestres.
Cellules ciliées des voies respiratoires, de canaux génitaux. Flagelle des spermatozoïdes.

3 - Fuseau mitotique.



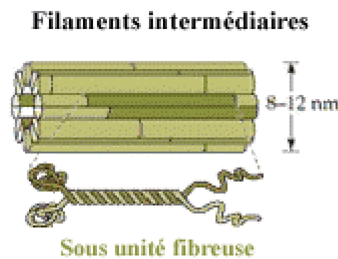
4 - Microtubules intracellulaires

Ce sont des guides ou glissières pour le déplacement des structures cellulaires d'origine golgienne.
Vésicules sécrétoires, microvésicules synaptiques des neurones.
Exemple des neurotubules



III- LES FILAMENTS INTERMEDIAIRES

Ce sont des fibres de 10 nm de diamètre, réparties dans la cellule selon une distribution similaire à celle des microtubules, c'est-à-dire concentrés autour du noyau et irradiant vers la périphérie de la cellule.



KEROUCHE KHALED
----
www.bac35.ahlamontada.net
khaled@live.fr

Les filaments intermédiaires sont regroupés selon 5 classes de protéines: kératines de type acide, kératines de type basique, vimentine et apparentés (ex : desmine, glial fibrillary acidic protein..), neurofilaments et lamines (dans le noyau). A l'inverse des microfilaments d'actine et des microtubules, les filaments intermédiaires ne présentent pas de polarité, et donc n'interviennent pas dans le transport directionnel. Ils interviennent surtout dans le maintien de la morphologie cellulaire, dans la résistance aux stress mécaniques et dans le maintien d'une cohésion entre les cellules (ex: épithélium) via l'ancrage aux desmosomes et plaques d'adhérence.

Les **filaments intermédiaires** ont une dimension intermédiaire (de 8 à 12 nm) entre les filaments fins d'actine et les microtubules formant à eux trois, le cytosquelette. En effet c'est d'abord dans les muscles qu'ils ont été décrits. Ce sont les structures les plus stables du cytosquelette. En effet, les traitements dissolvant les microtubules et les microfilaments laissent apparaître le réseau de filaments intermédiaires. De plus, ces structures semblent ne pas être démontées aussi souvent que les microtubules et les microfilaments. Elles constituent la charpente de la cellule. Vu leur structure moléculaire qui dépend d'un type cellulaire ou un autre on peut les utiliser notamment pour déterminer le tissu d'origine d'un cancer (grâce à des anticorps monoclonaux spécifique). Ils ne sont pas visibles en microscopie optique avec des colorations standards, pour les visualiser on peut utiliser:
- l'imprégnation argentique
- l'immunocytochimie.

les filaments intermédiaires sont présents dans le hyaloplasme et le nucléoplasme. Ce sont des polymères stables formés de protéines fibreuses.

Structure

Ce sont des constituants du cytosquelette qui sont formés de protéines fibrillaires assemblées de façon hélicoïdale. (Ce sont d'ailleurs les seuls filaments du cytosquelette à être constitués de protéines fibrillaires, les microfilaments et microtubules étant faits de protéines globulaires.) Il existe 5 sous types de filaments, qui sont des polymères de différents types de protéines fibrillaires (kératines de type acide, kératines de type basique, vimentine et apparentés, neurofilaments et lamines) ainsi que des protéines fibrillaires en rapport avec les cellules gliales. La nature des protéines est variable d'un type de cellule à l'autre : vimentine dans les fibroblastes, neurofilaments dans les neurones, cytokératine dans les cellules épithéliales, lamine

dans les noyaux, mais leur structure de base est identique. D'abord organisation en dimère, puis en protofilament (= tétramère, deux dimères surenroulés), puis association en quinconce, (souvent jusqu'à 8 protofilaments) pour former la structure finale: le filament. Ils ne présentent pas de polarité contrairement aux microfilaments et aux microtubules cependant le monomère de base est polarisé avec une extrémité N- et une extrémité C-terminale. Il en est de même pour le dimère qui conserve également une polarité.

Fonction

Ils concourent largement au maintien de la forme cellulaire et à l'ancrage des organites cellulaires. Ils interviennent dans la solidité de la cellule. Ils interviennent aussi dans l'adhérence et la cohésion cellulaire car ils sont en relation avec les desmosomes et les hémidesmosomes.

Au niveau de l'épiderme où ils sont développés, ils vont conférer aux cellules de l'épiderme une résistance aux frottements.

IV- ROLE DU CYTOSQUELETTE DANS LE TRANSPORT VIRAL

De la périphérie vers le centre de la cellule : transport rétrograde

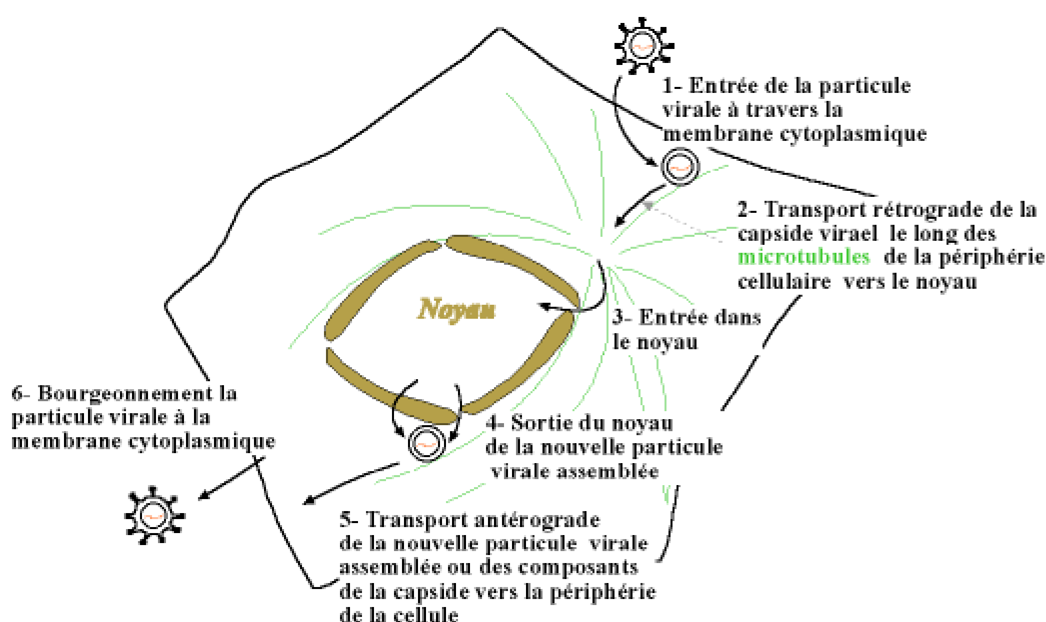
Les virus pénètrent dans la cellule par fusion de leur enveloppe virale avec la membrane plasmique ou, dans le cas d'endocytose récepteur-dépendante, par libération de la capside virale à partir de l'endosome. Pour beaucoup de virus, les étapes précoces de transport impliquent le réseau d'actine (ex: vaccine, VIH). Mais le transport vers le centre cellulaire (et pour nombre de virus, vers le noyau) implique l'utilisation du réseau microtubulaire. De nombreux virus utilisent dans ce cadre un transport rétrograde le long des microtubules, impliquant la dynéine cytoplasmique. Ceci a pu être démontré initialement pour le virus herpes simplex 1 (HSV -1), notamment par des expériences de dépolymérisation de microtubules, de co-localisation en immunocytochimie ou de vidéo-microscopie. Sur un modèle d'axone géant de calmar, Bearer et al. ont pu évaluer la vitesse d'un tel transport, 2.2 mm/sec., ce qui est compatible avec le transport rétrograde médié par la dynéine. Différentes approches ont montré l'implication des protéines du tégument du virus dans l'interaction avec la dynéine. Ces données ont été confortées par la découverte, pour d'autres virus, de protéines virales capables d'interagir avec une sous-unité de la dynéine, comme par exemple l'interaction de la phosphoprotéine du virus rabique avec la sous-unité LC8 de la dynéine (Jacob et al., 2000). La sous-unité LC8 de la dynéine est également impliquée dans le transport du virus ASFV (African Swine Fever Virus) (Alonso et al., 2001).

Du centre de la cellule vers la périphérie : transport antérograde

Ce type de transport est requis pour la libération des virions néo-formés. Il n'est pas indispensable dans le cas de virus libérés par lyse cellulaire. En revanche, dans le cas de bourgeonnement viral à la membrane plasmique, le réseau microtubulaire

sera utilisé, par l'intermédiaire de moteurs du transport antérograde de la famille des kinésines. Ainsi, il a été démontré que le virus HSV -1 utilisait le réseau microtubulaire dans les stades tardifs de l'infection pour sa libération à la périphérie du neurone (Miranda-Saskena, 2000). De même, le rétrovirus MuL V (Murine Leukemia Virus), est capable, par l'intermédiaire de la protéine structurale de capside Gag, de se lier à un moteur de type kinésine (KIF4) pour être acheminé du centrosome vers la périphérie (Kim et al., 1998). Ce rôle de la protéine Gag a également été démontré pour les virus HIV et SIV, pour un transport le long des microtubules, avant de faire intervenir le réseau d'actine au voisinage de la membrane plasmique pour permettre le bourgeonnement. Dans un tel contexte, le transport dépendant des microtubules concernerait plutôt le transport sur de longues distances dans la cellule, tandis que le réseau d'actine interviendrait dans les transports sur de courtes distances, notamment en ce qui concerne les phases de bourgeonnement viral. Un cas singulier est cependant fourni par le virus de la vaccine, qui est capable d'être propulsé par de véritables "comètes" d'actine, en utilisant la polymérisation de cette dernière (Wolffe et al., 1997), à l'instar de ce qui a été observé pour des bactéries intra-cellulaires telle Listeria ou Shigella, mais pourrait également utiliser le réseau microtubulaire pour être transporté vers la périphérie (Hollinshead et al., 2001).

Pour résumer :



Représentation schématique des différentes étapes du transport viral intra-cellulaire

KEROUCHE KHALED
----
www.bac35.ahlamontada.net
khaled@live.fr